动 物 学 研 究 2009，Oct. 30(5): 520−526 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.05520

肝癌组织及细胞系总 RNA 抽提逆转及基因克隆方法的改进与比较

易 濒[1,2],常 宏[1,2],曹 毅[1,*]

（1. 中国科学院动物模型与人类疾病机理重点实验室，云南 昆明 650223；2. 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：该文建立了高效肝组织及细胞总 RNA 抽提、反转录以进行基因克隆和实时定量 PCR（q-RT-PCR）的方法。比较了 2 种反转录酶(M-MLV 和 SuperScriptII)、2 种 cDNA 合成引物(Oligo dT 和 random 6 primer)对总 RNA 反转录效率的影响，与 4 种 DNA 聚合酶（Taq 聚合酶、Pfu 聚合酶、LA taq 聚合酶、Prime Star 聚合酶）进行长片段基因克隆的能力及效率；同时，该研究比较了不同质量总 RNA 对有效进行 q-RT-PCR 与长片段分子克隆的影响。新建立的 RNA 提取方法使得 RNA 完整性和均一性提高。RNA 的完整性及均一性对长片段 cDNA 的克隆至关重要。部分降解的组织 RNA 及细胞 RNA 仅适合于 q-RT-PCR 检测 mRNA 的表达水平，而不适合于 cDNA 的克隆。

关键词：肝癌组织及细胞系；总 RNA 抽提；反转录；q-RT-PCR；长片段基因克隆
中图分类号：Q344；Q78；R735.7；Q813.1 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)05-0520-07

Improvement of Methods for Total RNA Extraction from Hepatocarcinoma Tissues and Cell Lines and Comparison of Reverse Transcription and cDNA Cloning Strategies

YI Bin[1,2], CHANG Hong[1,2], CAO Yi[1,*]

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Diseases Mechanisms , Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan* 650223, *China;* 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*）

Abstract: In this report, we have developed efficient methods for total RNA extraction from hepatocarcinoma tissues and cell lines, reverse transcription, cDNA cloning and quantitive real-time PCR (q-RT-PCR). We compared the effect of two reverse transcriptase (M-MLV, SuperScriptII) on the efficiency of total RNA reverse transcription and four DNA polymerase (Taq polymerase，Pfu polymerase, LA taq polymerase，Prime Star polymerase) in cloning large fragment of cDNA. The impact of different RNA integrity on q-RT-PCR and large fragment of cDNA cloning had also been investigated in this study. The newly developed RNA extraction method greatly improved the integrity of total RNA. We found that the integrity of total RNA is vital to large fragment cDNA cloning. RNA degraded at some extent is only suitable for q-RT-PCR analysis but not for cDNA cloning.

Key words: Hepatocarcinoma tissues and cell lines; Total RNA extraction; Reverse transcription; q-RT-PCR; Cloning of large fragment cDNA

肝脏疾病（肝炎肝硬化，肝癌）在我国已十分普遍。肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是我国常见的恶性肿瘤，其死亡率位居第二。中国每年新增肝癌患者达 50 万，中国每年约有 20 万人死于肝癌（Jackson et al, 2003; Herath et al, 2006）。肝细胞癌的发生、发展是多因素引起以及多步骤的复杂过程。寻找肝细胞癌发生、发展的相关基因将为了解肝细胞癌的分子遗传学机制和肝细胞癌的诊断、治疗提供理论基础(Qi et al, 2008)。

在实际研究中，抽提肝组织和细胞总 RNA，逆

收稿日期：2009-04-30；接受日期：2009-06-10
基金项目：国家自然科学基金（30800407）
*通讯作者（Corresponding author），博士生导师，E-mail:caoy@mail.kiz.ac.cn
第一作者简介：易濒，男，硕士研究生，从事分子病理研究。E-mail:yibin0721@163.com

转为cDNA而进行基因表达分析和基因克隆研究是常用的实验方法，采用一套高效稳定的 RNA 抽提方法、基因表达分析及克隆体系对基因的研究至关重要。目前，影响 q-RT-PCR 和长片段基因克隆的因素主要有 RNA 完整性和均一性、反转录酶、cDNA合成引物及DNA聚合酶的效率等。由于RNA酶广泛存在且不易灭活，在实际研究中经常很难做到顺利获得高质量的 RNA（Li et al, 2002；Yan et al, 2004)。获得高质量的 RNA 用于基因表达及基因克隆是实验中经常遇到的问题。

采用优化的反转录体系（反转录酶、cDNA合成引物）和较强的DNA酶聚合能力，以及高保真度对q-RT-PCR和长片段基因克隆实验体系的建立具有非常重要的作用。在实际研究中经常遇到GC含量高或二级结构较多的mRNA模板。它能使反转录酶停止后，从RNA模板上脱落或滑过RNA的loop 区（Malboeuf et al, 2001）。MMOL/LLV反转录酶的RNase H^-突变体比其他酶能够将更大部分的RNA转换成cDNA（Kotewicz et al, 1988; Gerard et al, 1992），随机 6 碱基寡核苷酸引物这一最不特异的引物可以拷贝全长mRNA（Compton T, 1990; Lee et al, 1990），Oligo(dT)能特异与绝大多数真核mRNA所具有的 3'端poly(A)尾配对（Frohman et al, 1988），且Cheng et al（2001）从正常人乳腺组织中提取总RNA，以Oligo(dT)为引物合成cDNA第一链，然后用高保真的Platinum Taq DNA 聚合酶扩增出长 2 136 bp的人乳铁蛋白cDNA。我们总结建立了一套行之有效基因表达分析及克隆的实验体系，通过比较，选择合适的反转录酶、cDNA合成引物及DNA聚合酶并且优化实验体系，进行q-RT-PCR检测目的基因表达以及长片段基因克隆。我们新建立的方法，将为建立相关基因表达及克隆体系提供高效且经济的选择，并对q-RT-PCR研究基因表达及进行长片段基因克隆有指导作用，也为基因功能研究奠定实验技术基础。

1　材料和方法

1.1　材　料

（1）标本信息　人新鲜肝脏组织标本，采集后立即置于液氮中保存。人肝癌细胞系HepG2培养于10%小牛血清DMEM (100 U/mL 青霉素，100 U/mL链霉素) 六孔板或25 cm^2培养瓶中。

（2）主要试剂　总RNA快速提取试剂盒（BioTeke Corp., Beijing, China）、M-MLV反转录酶(Promega)、Superscript II（Qiagen）、Jumpstart taq酶 (Sigma)、Taq聚合酶（TaKaRa）、Pfu聚合酶（Promega）、LA taq聚合酶（TaKaRa）、Prime Star聚合酶（TaKaRa）等。

（3） 引物序列　6碱基随机引物和oligo-dT购买于上海生工，其他引物均由上海生工合成。

1.2　方　法

1.2.1　总RNA的提取

传统一步法：使用一次性的RNase-free枪尖，或于0.1% DEPC水浸泡过夜并用高压蒸汽灭菌的枪尖和Eppendoff管。取米粒大小的组织于研钵，尽量研磨组织使其成冰冻的粉末状，保持液氮不蒸发完全，用小勺将所有冰冻粉末加入到1 mL的TRIzol或试剂盒中配的裂解液中，在振荡器上震荡混匀。细胞系培养于含10%小牛血清DMEM (100 U/mL青霉素，100 U/mL链霉素) 六孔板或25 cm^2培养瓶中，至生长呈对数期，直接加入TRIzol或裂解液到六孔板或25 cm^2培养瓶中，并用移液枪反复吹打混匀。

改良方法：提前把 1mL试剂盒中配的裂解液加入到用 0.1% DEPC处理过的 1.5 mL离心管中，从液氮灌中取米粒大小组织装入冰冻的研钵，并加入少许液氮到研钵中，尽量研磨组织使组织成冰冻的粉末状，保持液氮不蒸发完全。用DEPC处理的 1 mL吸头，吸取少量裂解液（保持吸头具有一定的黏附能力），沾取少量粉末组织加入到裂解液中反复吹打使裂解完全。当裂解液要变混浊时且黏稠度合适时，停止加入粉末组织，以避免组织过量而导致RNA降解。细胞系培养于含 10%小牛血清DMEM (100 U/mL青霉素，100U/mL链霉素)六孔板中，至生长呈对数期，37℃胰酶消化 1 min左右，倒置显微镜观察消化情况，当细胞变圆，立即加入新鲜含有血清的培养基，以终止消化作用。制成细胞悬液并调整细胞数量，细胞计数使细胞总数目约 1×10^6，然后加入到15 mL离心管中，300 g离心 10 min。弃上清，轻柔弹散离心所得细胞，加入TRIzol或裂解液剧烈震荡。

1.2.2　RNA 的检测

（1） RNA完整性的检测　取RNA样品2 μL，加入加样缓冲液，60 ～ 70V 1.0%琼脂糖凝胶电泳40min。EB染色，凝胶成像仪检测。

（2）RNA浓度及纯度分析　使用无RNA酶的超纯水以1∶50 稀释总RNA产物，核酸蛋白分析仪读

数，分析RNA样品的浓度及纯度。1.9≤OD_{260}/OD_{280}≤2.1为纯RNA，OD_{260}/OD_{280}≥2.0无盐污染。

1.2.3 实时定量q-RT-PCR

（1）基因组DNA消化。DNA消化：5.0 μL 10X的消化缓冲液，10 U的DNase Ⅰ，30 U RNase inhibitor，10 μg≤RNA及RNase-Free H_2O补充至50.0 μL。上述混合物在37℃孵育30 min。加入0.5 mol/L DEPC水处理的EDTA 2.0 μL，于65℃ 孵育20 min，灭活DNase Ⅰ。

（2）反转录。取≤4 μg的总RNA，分别加入5.0 μL 6碱基随机引物（100 μmol/L）和/或0.5 μL oligo-dT(100 μmol/L)，充分混匀之后，70℃孵育5 min，立即置于冰上，2 min以上。反转录：5X的反转录缓冲液，2.5 μL dNTP（10 mmol/L each），200 U的反转录酶，30 U RNase inhibitor。置于42℃ 或37℃或50℃ 孵育60 min以上，85℃ 5 min，保存cDNA于－20℃。

（3）实时定量PCR 将反转录得到cDNA稀释100倍，进行实时定量PCR。扩增体系50.0 μL：10×PCR 缓冲液，1.25 U Jumpstart taq酶，10 pmol/L上游引物，10 pmol/L下游引物，0.2 mmol/L dNTP，2.0 μL模板cDNA，和0.2×SYBR Green，样品混合后于定量PCR仪上（ABI 5700型，Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）反应。实时定量PCR 引物为：Symplekin-F，5'-AAACGCATGTATGAGAAGGAGC -3'，Symplekin-R，5'-GCCAGGTAGAGGTACAGAC AC -3'；β-Actin-F，5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC -3'，β-Actin-R，5'- CAGGAAGGAAGGCTGGAAG -3'。循环条件：95℃预变性30 s，95℃变性10 s，60℃退火延伸共30 s，扩增共40个循环。超纯水作为PCR的阴性对照，每个样本平行检测3次，β-actin作为内参，结果使用相对定量$2^{-\triangle\triangle CT}$方法来分析symplekin (Kenneth et al, 2001)。PCR产物于3%的琼脂糖凝胶电泳检测。产物单一的溶解曲线峰及琼脂糖凝胶电泳单一条带为特异性扩增。

1.2.4 基因克隆

Symplekin mRNA长度为4188 bp，编码框大小为3 825 bp。实验分别采取分段克隆以及完全克隆的方法。symplekin 5'端克隆引物：F primer，5'-GGCGACGAACGGAAGATG-3'，R primer，5'-TAGGCGTTGTACTCCTGGTAG-3'；symplekin 3'端克隆引物：F primer:5'-AGGCCA-GAGCCCATTATCC-3'，R primer:5'-AAAGCACCC-GCAGGTCAA-3'；symplekin全长编码序列克隆引物：F primer，5'-GAGCTGCGCTGACAGCAGCCA-3'，R primer，5'-GAGCCCCGTCAGCTGTTCCCC-3'。 分段法将symplekin cDNA分成两个片段：141 ~2134 bp；1 809 ~4148 bp。两个片段重叠区有一个*Bam* HI酶切位点，而在cDNA其他部分无此酶切位点。产物使用1%琼脂糖电泳分离，胶回收试剂盒回收产物，将产物克隆至T载体上。酶切鉴定后，测序。*Bam*H I分别酶切两个片段，胶回收，然后连接两个片段，扩增整个全长cDNA，最后酶切测序鉴定。用Taq聚合酶、LA taq聚合酶、Prime Star聚合酶和Pfu聚合酶分别扩增symplekin 5'端、3'端，其扩增程序为：95℃预变性2 min，95℃变性30 s，60℃退火30 s，72℃延伸150 s或4 min，扩增共35个循环，终延伸72℃ 5 min。用Taq聚合酶、Prime Star聚合酶、LA taq聚合酶和Pfu聚合酶扩增symplekin全长编码序列，其扩增程序为：95℃预变性2 min，95℃变性30 s，60℃退火30 s，72℃延伸270 s，扩增共35个循环，终延伸72℃ 5 min。

2 结 果

2.1 总 RNA 提取完整性及均一性改善

总RNA提取经过改进，其质量完整性和均一性得到明显改善。琼脂糖凝胶电泳结果表明，采用传统一步法获得的肝癌组织和肝癌细胞系总RNA有降解，28S和 18S两条主带分辨不清（图 1）；采用改良方法获得的总RNA的 28*S*和 18*S*两条主带清晰，无拖尾降解现象发生（图 1）。28*S*与 18*S*的比值接为 2∶1，OD_{260}/OD_{280}比值为 2.0，OD_{260}/OD_{280}≥2.0。

2.2 部分降解的组织 RNA 及细胞 RNA 仅适合于 q-RT-PCR 检测 mRNA 的表达水平

以部分降解的 HepG2 RNA、肝癌组织 RNA 和完整的 HepG2 RNA、肝癌组织 RNA 相应反转录产物为模板，进行 q-RT-PCR 检测 symplekin mRNA 和 actin mRNA 的表达水平变化。结果显示部分降解 HepG2 RNA symplekin 3 次 q-RT-PCR 的平均 Ct 值为 27.21，β-actin 平均 Ct 为 19.96，部分降解 HepG2 RNA Δ*Ct*=27.21－19.96=7.25(图 2)。完整 HepG2 RNA symplekin 3 次 q-RT-PCR 的平均 Ct 值为 24.8，β-actin 平均 Ct 值为 17.34，完整 HepG2 RNA Δ*Ct*=24.8－17.34=7.46（图 2）。部分降解 HepG2

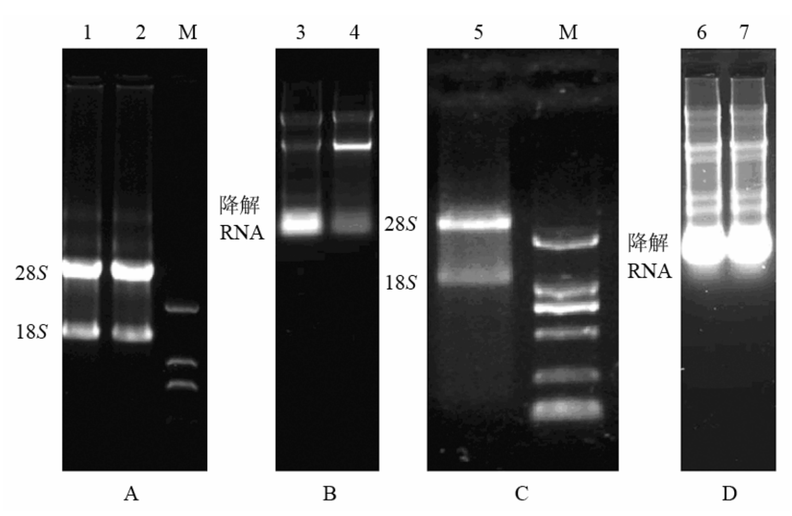


图 1　改良前 Hepg-2 肝癌细胞系(B)和肝癌组织(D) RNA 电泳图及改良后 Hepg-2 肝癌细胞系(A)和肝癌组织(C)RNA 电泳图

Fig. 1　RNA electrophoresis of hepatocarcinoma tissues and Hepg-2(hepatocellular carcinomas cell line) before improvement and after improvement

1、2、3、4：HepG2 总 RNA （Total RNA of HepG2）；5、6、7：肝癌组织总 RNA （Total RNA of Hepatocarcinoma tissues）；M：D2000 分子量标记（marker）。

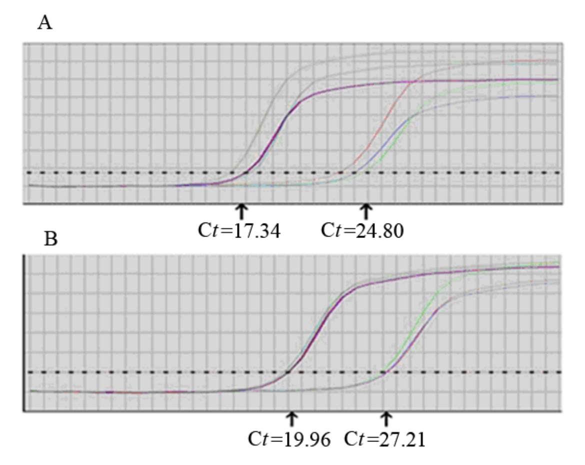


图 2　q -RT-PCR 定量 Symplekin 和 β-actin mRNA 扩增曲线

Fig. 2　Amplification plot of symplekin and β-actin mRNA quantitated by q-RT-PCR

完整的(A)和部分降解的（B）HepG2 RNA。横轴代表循环数，纵轴代表荧光强度。

Integrity（A） and partial degradation（B） HepG2 RNA. Horizontal axis represents cycle number, Longitudinal axis represents fluorescence intensity.

RNA 定量 ΔCt 值与完整 HepG2 RNA 定量 ΔCt 值非常接近。

2.3　RNA 质量、反转录条件及 DNA 聚合酶对长片段基因克隆的影响

分别比较了 2 种反转录酶、2 种 cDNA 合成引物及 4 种 DNA 聚合酶对长片段基因克隆实验体系的影响。经过比较，RNA 质量完整均一时，选用 RNase H 活性较低，cDNA 合成长度 10 kb 以下且价格合理的 M-MLV 反转录酶逆转，使用随机 6 碱基寡核苷酸引物，37℃逆转，成功克隆了 Symplekin 5'端（表 1）；使用 Oligo(dT)，45℃逆转，成功克隆了 Symplekin 3'端（表 1）；使用 Oligo(dT)，45℃逆转，成功克隆 Symplekin 全长（表 1）。而 RNA 质量差时，选用 M-MLV 反转录酶逆转，使用随机 6 碱基寡核苷酸引物，37℃逆转，成功克隆了 Symplekin 5'端（表 1）；Symplekin 3' 端和 Symplekin 全长克隆均不成功（表 1）。

分别以完整性好及完整性差的 RNA 反转录产物为模板，使用 Taq 聚合酶，Pfu 聚合酶均不能克隆 Symplekin 5'端、Symplekin 3'端和 Symplekin 全长。LA taq 聚合酶与 Prime Star 聚合酶均成功克隆了 Symplekin 5'端、Symplekin 3'端和 Symplekin 全长，但其 DNA 高保真度差异较大（表 2）。以 LA taq 聚合酶扩增得到的 Symplekin 5'端片段长度为 1994 bp，经过测序，11 克隆中，仅有 1 个克隆序列完全无错配碱基，可以用于哺乳动物细胞表达实验；以 Prime Star 聚合酶扩增 Symplekin 全长基因，其序列长度为 3853 bp，得到的克隆中，每 4 个克隆中仅有 1 个克隆发生碱基错配。

3　讨　论

3.1　RNA 质量的改善

表 1 RNA 质量、反转录条件及 DNA 聚合酶对长片段基因克隆的影响
Tab. 1 Impact of RNA quality, reverse transcription condition and DNA polymerase on cloning of large fragment cDNA

逆转录酶 Reverse transcriptase	项目 Item	RNA 质量好 Good RNA	RNA 质量差 Bad RNA
	Symplekin5' 端，随机引物 37℃逆转	√	√
	Symplekin3' 端，Oligo(dT) 45℃ 逆转	√	×
M-MLV	Symplekin3' 端，Oligo(dT) 42℃ 逆转	×	×
RT	Symplekin 全长，Oligo(dT) 45℃ 逆转	√	×
	Symplekin 全长，Oligo(dT) 42℃ 逆转	×	×
SuperScript II	Symplekin 全长，Oligo(dT) 50℃ 逆转	√	×

√：使用扩增能力和高保真度高的 LA taq 聚合酶、Prime Star 聚合酶克隆成功；×：使用 Taq 聚合酶、Pfu 聚合酶、LA taq 聚合酶、Prime Star 聚合酶克隆均不成功。
√: Having succeeded in cloning by using LA taq polymerase and prime star polymerase of high amplification ability and fidelity; ×: Having Failed to clone it by using Taq polymerase, Pfu polymerase and LA taq polymerase.

表 2 4 种常见 DNA 聚合酶特性的比较
Tab. 2 Comparison of four common DNA polymerase

DNA 聚合酶（DNA polymerase）	扩增能力 Amplification ability	保真度 Fidelity
Taq 聚合酶 Taq polymerase	++	+
Pfu 聚合酶 Pfu polymerase	+	++++
LA taq 聚合酶 LA taq polymerase	+++++	+++
Prime Star 聚合酶 Prime Star polymerase	+++	+++++

总 RNA 抽提是应用 RNA 进行分子生物学各方面研究的基础，如 cDNA 文库的构建、实时定量 RT-PCR、基因克隆等，而 RNA 质量的完整性和均一性是决定这些实验成败的关键。以往"一步法"(Chomcaynski et al, 1987) 或 acid-guanidine-phenol-chloroform（AGPC）法的优点是有强烈的蛋白变性剂，它能强烈抑制材料及提取液中的 RNA 酶的活性，收获的非降解 RNA 产量大、纯度高，不需超速离心或多步酚-氯仿抽提，抽提时间大大缩短，得到广泛的应用，并有成熟的产品(Trizol 等)供应，是最常使用的方法。但在提取组织时，尤其是从富含蛋白质组织中抽提 RNA 时，往往蛋白质抽提不净，影响 RNA 质量，而且 Trizol 试剂价格昂贵 (Zhang et al, 2004; Li et al, 2002)。在传统"一步法"抽提动物组织总 RNA 的基础上，Zhou et al（2008）通过增加抽提步骤或改进了提取过程中的部分操作步骤，使总 RNA 与细胞 DNA、蛋白质、细胞残片等干扰总 RNA 质量的杂质有效分离(Zhou et al, 2008; Zhang et al, 2006; Wu et al, 2005; Yi et al, 2008; Cao et al, 2003)，但操作步骤越多，外源性 RNA 酶导致 RNA 降解的几率就越大，且现在试剂盒抽提效果还比较稳定，无须增加大的步骤。实验容易忽视的是细节上的操作，如组织过量会释放内源性的 RNA 酶而 TRIzol 或裂解液加入不足，从而导致 RNA 降解。对此，我们改进肝癌组织的 RNA 提取方法。通过吸头沾取少量粉末组织加入裂解液中反复吹打使裂解完全，在裂解液要变混浊时且黏稠度合适时停止加入粉末组织，以避免组织量过量裂解不完全而导致 RNA 降解。对于抽提细胞 RNA，依据细胞的数量而不是依据培养板的面积来决定所加入的裂解液体积，以避免细胞数量过多而导致 RNA 降解。通过改进 RNA 抽提方法，总 RNA 质量完整性和均一性得到了明显改善。

3.2 比较不同完整性的 RNA 对于 q-RT-PCR 及长片段克隆的可用程度

q-RT-PCR 扩增的片段最适长度为 80～200 bp 之间小片段。我们发现完整的和部分降解的组织细胞 RNA 都可用于 q-RT-PCR 检测小片段 mRNA 表达水平。这说明 RNA 虽然降解，但不能降解成单个或几个核苷酸的片段，且降解存在非随机性，因此，q-RT-PCR 仍可用于 RNA 已部分降解的标本的 mRNA 定量，而且可以分析在病理变化期间核酸量的变化。Lehmann (2001)认为 FFPE 组织提取的 mRNA 大多断裂为短片段状态，平均约 200 bp 左右。最近的报道 (Xiao et al, 2008；Jing et al, 2007) 叙述了从保存的石蜡包埋组织样品分离和精确反

复定量 mRNA 表达水平以及 MiroRNA（一种 20～25 核苷酸的小 RNA)，且 MiroRNA 在石蜡包埋组织样品中能稳定检测到，不会降解，提示小片段的 RNA 较为稳定，其可能有种新的防降解的机制。

3.3　多种反转录体系及多种 DNA 聚合酶在克隆 4 kb 的全长 cDNA 中的效率对比

3.3.1　反转录体系的选择　克隆大于 4 kb 的 cDNA 片段，除了 RNA 质量要完整均一外，反转录酶的效率、mRNA 的复杂二级结构及高 GC 含量和 cDNA 合成引物的选择都是需要考虑的重要因素，且这些因素直接影响长片段基因克隆的效率。

对于质量完好的 RNA，本实验室选用 oligo-dT 及反转录效率较高的 M-MLV 反转录酶逆转。oligo-dT 能特异结合 mRNA 在 3' 端 poly(A)（Frohman et al，1988)，所以只有 mRNA 被逆转，而 poly(A)＋RNA 只占总 RNA 群体的 1%～2%. 因此，逆转得到的 cDNA 比用随机 6 碱基寡核苷酸引物时在数量和复杂性方面都要小并易于克隆 Symplekin 全长。由于 Symplekin cDNA 3' 端有很高的 GC 含量，M-MLV 反转录酶最高耐受温度为 45 ℃，所以我们选用 45℃反转录 Symplekin，经过 LA taq 聚合酶或 Prime Star 聚合酶扩增获得 Symplekin 基因 3'端及全长基因。在实验中，对于相同样本的 RNA，在其余条件均相同的条件下，使用 42℃进行反转录得到的产物，无法扩增得到 Symplekin 基因 3'端及全长基因。该结果提示，在使用 oligo-dT 作为反转录引物时，适度提高反转录的温度，有利于具有复杂二级结构且 GC 含量高的 mRNA 分子进行反转录，对于目的基因全长的克隆十分有利。

随机 6 碱基寡核苷酸引物能够非选择性地反转录细胞内所有 RNA 分子，并且其反转录不需要特定的 mRNA ployA 尾。这对于检测非 polyA RNA 分子有明显的优势。在癌组织 RNA 提取时，由于肿瘤细胞的凋亡或坏死，难免产生降解的 mRNA 分子，随机 6 碱基寡核苷酸引物就可以对这种 mRNA 分子进行较好反转录。本实验中，对比了经过随机 6 碱基寡核苷酸引物反转录的质量好、部分降解的总 RNA，并以 q-RT-PCR 检测了两者的β-actin 及 symplekin 的表达水平，实验结果提示部分降解的 RNA 通过随机 6 碱基寡核苷酸引物反转录，其产物对于考察基因表达水平的影响，几乎可以忽略不计。然而，以随机 6 碱基寡核苷酸引物反转录部分降解的总 RNA，其产物虽然可以扩增获得 Symplekin 5'端，但 Symplekin 3'端及 Symplekin 基因全长则无法扩增。该结果提示了随机 6 碱基寡核苷酸引物在反转录质量较差的 RNA 分子时的重要作用；同时，也证明了对于全长基因的克隆，使用高质量的 RNA 分子及 oligo-dT 引物的必要性。SuperScriptII 反转录酶 RNase H 低，反转录效率更高，更容易合成 cDNA 全长。该酶热稳定性高，可在更高温度（50～60℃）下反转录合成 cDNA，从而有利于具有复杂二级结构、高 GC 含量的 RNA 的反转录。本实验室选用 oligo-dT 配合 SuperScriptII 反转录酶，使用 50℃反转录得到的产物亦成功克隆了 Symplekin 全长。

对于克隆类似 Symplekin 基因片段在 4 kb 左右且 GC 含量高的 cDNA 片段，我们建议使用 SuperScriptII 反转录酶，这种酶反转录效率更高，更容易合成 cDNA 全长，且热稳定性更高，可在 50～60℃下反转录合成 cDNA，从而有利于复杂二级结构、高 GC 含量的 RNA 的反转录。

3.3.2　DNA 聚合酶的选择　Taq DNA 聚合酶由于其价格便宜且耐热半衰期足以满足常规 PCR 实验而被广泛使用，该酶的扩增产物末端具有 A 尾，可以直接应用于 T-vector 克隆实验。然而，该酶在长片段基因克隆表达时，表现出的多种不足，例如：较弱的聚合活性、难以扩增高 GC 含量的片段及高保真度差等难以被应用于基因的克隆表达(表 2)。

Pfu DNA 聚合酶尽管拥有最高的聚合保真度及耐热半衰期，但是，较弱的聚合活性导致其对于具有复杂结构的长片段基因克隆无能为力，并且该酶的产物为平末端（表 2），不能直接应用于 T-vector 克隆实验。

LA taq 及 Prime Star DNA 聚合酶，具有非常高的聚合活性，常用来扩增具有复杂二级结构的 DNA 片段。LA taq 聚合酶的保真度较高，对于 1 kb 以下的 DNA 片段，可以保证其扩增产物的高保真，且该酶的扩增产物为混合末端，一部分产物本身具有 A 尾（表 2），可以用来直接进行 T-vector 实验；但是，本实验的结果表明，LA taq 的扩增 2kb 以上的 DNA 片段，难以保证扩增产物用于真核表达实验。

尽管 Prime Star 聚合酶的活性略弱于 LA taq 聚合酶（表 2），但是，其高保真度可以媲美 Pfu，对于长片段 DNA 的克隆表达实验，Prime Star 聚合酶表现出了其无可替代的优势。

参考文献：

Cao TB, Peng JH, Gong Y, Ye ZJ, Jiang Y. 2003. Isolation and purification of RNA from frozen tissues by Tripure reagent [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, **25**(9): 822-823. [曹廷兵, 彭家和, 巩 燕, 叶治家, 江 渝. 2003. 一种用 Tripure 试剂从冻存组织分离纯化 RNA 的方法. 第三军医大学学报, **25**(9): 822-823.]

Chomcaynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA Isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenchloro chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, **161**(1): 156-159.

Compton T. 1990. Degenerate primers for DNA amplification [C]// PCR protocols. A guide to methods and applications . San Diego: Academic Press Inc, 39-45.

Cheng H, Chen XZ, Huan LD. 2001. cDNA Cloning and Sequence Analysis of Human Lactoferrin [J]. *Chn J Biotechnol,* 17: 385-387.[程 华, 陈秀珠, 还连栋. 2001. 人乳铁蛋白cDNA的克隆及序列分析. 生物工程学报, **17**: 385-387.]

Frohman MA, Dush MK, Martin GR. 1988. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 89-98.

Gerard GF, Schmidt BJ, Kotewicz ML, Campbell JH. 1992. cDNA synthesis by Molney murine leukemia virus RNase H-minus reverse transcriptase possessing full DNA polymerase activity [J]. *Focus*, **14**: 91.

Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. 2006. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, **21**: 15-21.

Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Muñoz A, Kensler TW, Qian GS, Groopman JD. 2003. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients [J]. *Carcinogenesis*, **24**(10): 1657-1663.

Jing HL, Paul S, Richard F, Susanne C, Karen D, Sinead A, Simone MG, John JL, Orla S. 2007. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells [J]. *BMC Biotechnol* **,** **7**(36): 1-6.

Kotewicz ML, Sampson CM, DAlessio JM, Gerard GF. 1988. Isolation of a cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity[J]. *Nucleic Acids Res*, **16**: 262-277.

Kenneth JL, Thomas DS. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-△△CT method [J]. *Methods*, **25**: 402-408.

Li JZ, Chang XT, Lin J, Huang GF, Zhou JG. 2002. Improved method of high quality total RNA isolation and purification from animal tissue and its usage [J]. *Lett Biotechnol*, **13**(5): 346-348.[李杰之, 常晓彤, 林 坚, 黄翠芬, 周建光. 2002. 从动物组织提取高纯度总RNA方法的改进及应用. 生物技术通讯, **13**(5): 346-348.]

Lee CC, Caskey T. 1990. cDNA cloning using degenerate primers [C]// PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press Inc, 46-53.

Lehmann U, Kreipe H. 2001. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies [J]. .*Methods*, **25**(4): 409-418.

Malboeuf CM, Isaacs SJ, Tran NH, Kim B. 2001. Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis [J]. *Biotechniques*, **30**(5): 1074-1078.

Qi P, Gao CF. 2008. Progress and Insight of miRNA on Hepatocellular Carcinoma [J]. *Chn Biotechnol*, **28**(12): 94-101. [戚 鹏,高春芳. 2008. miRNA 在肝细胞癌中的研究进展. 中国生物工程杂志, **28**(12): 94-101.]

Wu JW, Yang GS, Sun C. 2005. Improvement of Methods for Extracting Total RNA from Adipose [J]. *Biotechnol Bull*, **5**: 76-78. [吴江维, 杨公社, 孙 超. 2005. 脂肪组织RNA 提取方法的改进. 生物技术通讯, **5**: 76-78.]

Xiao Z, Jiamin C, Tom R, Dave L, Victor T, Harriet F. 2008. An array-based analysis of MicroRNA expression comparing matched prozen and formalin-fixed earaffin-embedded human tissue samples [J]. *J Mol Diagn*, **10**(6): 513-519.

Yi SH, Yi YS, Zhou X. 2008. Isolation of Total RNA from Rat Liver Tissue by Improved Trizol Method [J]. *Pract Prev Med*, **15**(1): 10-12. [易尚辉, 易银沙, 周 鑫, 袁炳秋, 许 丹,吕 媛. 2008. 改进 TRIpure 法提取小鼠肝脏组织总 RNA. 实用预防医学, **15**(1): 10-12.]

Yan YP, Liu SH, Wang ZZ. 2004. A method for high quality of total RNA extracted from Salvia miltorrhiza [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, **24**(10): 1936-1939. [闫亚平, 刘世海, 王喆之. 2004. 一种丹参高质量总RNA 的提取方法. 西北植物学报, **24**(10): 1936-1939.]

Zhang GJ, Wei YF, Tang RH, Guan DY, Liu SH, Zhuang WJ. 2004. Study on the methods of RNA isolation from young peanut embryo**s** [J]. *J Fujian Agri Fore Univ*, **33**(1): 1-4. [张君诚, 魏彦飞, 唐荣华, 官德义, 刘思衡, 庄伟建. 2004. 花生幼胚RNA提取方法研究. 福建农林大学学报: 自然科学版, **33**(1): 1-4.]

Zhou ZK, Ji AG, Ma TH, Huai YH, Wang SH, Xu SZ, Gao X, Cheng JB, Ren HY, Zhang LJ, Qi MB. 2008. Extraction of high quality of total RNA and mRNA Cattle tissue [J]. *Chn Herb Anim*, **28**(1): 12-14. [周正奎, 姬爱国, 马腾壑, 淮亚红, 王淑辉, 许尚忠, 高 雪, 陈金宝, 任红艳, 张丽君, 祁茂彬. 2008. 牛组织高质量总 RNA 和 mRNA 的提取. 中国草食动物, **28**(1): 12-14.]

Zhang ZD, Cao ZY, Zheng T, Cai J. 2006. The improvement of extraction methods of total RNA from rat brain tissue [J]. *Lett Biotechnol*, **17**(5): 760-761.[张志灯, 曹治云, 郑 腾, 蔡 晶. 2006. 改良的大鼠脑组织总 RNA 抽提方法. 生物技术通讯, **17**(5): 760-761.]